8 月 August
2019, 62(8): 930-936
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http://www.insect.org.cn
doi: 10.16380/j.kcxb.2019.08.005

家蚕微孢子虫感染对家蚕海龟蛋白(Bmtutl)基因表达水平的影响

朱 峰, 高建华, 张永红, 肖圣燕, 邵榆岚, 唐芬芬, 白兴荣*

(云南省农业科学院蚕桑蜜蜂研究所, 云南蒙自 661101)

摘要:【目的】本研究旨在阐明家蚕微孢子虫 *Nosema bombycis* 感染不同时间对家蚕 *Bombyx mori* 幼虫不同组织中家蚕海龟蛋白(*Bombyx* Turtle, Bmtutl)基因表达水平的影响,为揭示家蚕微孢子虫的侵染机制奠定基础。【方法】利用生物信息学方法对家蚕海龟蛋白3种亚型Bmtutl-464, Bmtutl-519和Bmtutl-810的序列结构特征进行了分析;利用qPCR检测家蚕微孢子虫感染后12, 24, 48, 72, 96和120 h,家蚕幼虫中肠、血淋巴与脂肪体组织中*Bmtutl*-464, *Bmtutl*-519和*Bmtutl*-810基因表达水平的变化情况。【结果】家蚕海龟蛋白3种亚型的二级结构均主要由无规则卷曲、α螺旋、β转角和延伸链组成,其中无规则卷曲所占比例最高。但是PredictProtein分析发现,Bmtutl-464, Bmtutl-519和Bmtutl-810之间的蛋白/多核苷酸结合位点存在较大差异。qPCR结果表明,感染家蚕微孢子虫后,家蚕幼虫中肠、血淋巴与脂肪体组织中*Bmtutl*-464, *Bmtutl*-519和*Bmtutl*-810基因的整体表达处于被抑制状态,尤其在脂肪体中最为明显:*Bmtutl*-519和*Bmtutl*-810基因的表达在家蚕微孢子虫感染家蚕后的72 h开始受到显著抑制,特别是*Bmtutl*-519基因,其相对表达水平均不到对照的5.0%。【结论】家蚕海龟蛋白这3种亚型的序列结构特征存在较大差异,家蚕微孢子虫感染在一定程度抑制了家蚕幼虫中肠、血淋巴与脂肪体组织中*Bmtutl*-464, *Bmtutl*-519和*Bmtutl*-810基因尤其是*Bmtutl*-519的表达。结果说明,与其他两种家蚕海龟蛋白亚型相比,Bmtutl-519蛋白可能在家蚕微孢子虫侵染宿主的过程中起主要作用。

关键词: 家蚕; 家蚕微孢子虫; 家蚕海龟蛋白; 序列分析; 时相表达

中图分类号: Q966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2019)08-0930-07

Effect of *Nosema bombycis* infection on the expression level of *Bombyx* Turtle (Bmtutl) gene in *Bombyx mori*

ZHU Feng, GAO Jian-Hua, ZHANG Yong-Hong, XIAO Sheng-Yan, SHAO Yu-Lan, TANG Fen-Fen, BAI Xing-Rong* (Institute of Sericulture and Apiculture, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Mengzi, Yunnan 661101, China)

Abstract:【Aim】The aim of this study is to elucidate the effect of *Nosema bombycis* infection on the expression level of *Bombyx* Turtle (Bmtutl) gene in different tissues of larvae of the silkworm (*Bombyx mori*) at different time post infection, so as to lay the foundation for revealing the infection mechanism of *N. bombycis*.【Methods】The sequence characteristics of three isoforms of Bmtutl (Bmtutl-464, Bmtutl-519 and Bmtutl-810) of *B. mori* were analyzed by bioinformatics methods. The expression levels of *Bmtutl*-464, *Bmtutl*-519 and *Bmtutl*-810 in the midgut, hemolymph, and fat body of *B. mori* larvae

基金项目: 国家自然科学基金项目(31560675); 云南省应用基础研究计划项目(2018FD127); 云南省现代农业蚕桑产业技术体系(2013KJTX006); 云南省农业科学院应用基础研究专项(YJM201710)

作者简介: 朱峰, 男, 1984年1月, 山东枣庄人, 博士, 副研究员, 研究方向为昆虫病理与分子生物学, E-mail: zf200537@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: bxrong3@163.com

收稿日期 Received: 2019-03-22; 接受日期 Accepted: 2019-05-27

infected by *N. bombycis* at 12, 24, 48, 72, 96 and 120 h post inoculation, respectively, were detected by qPCR. 【Results】The secondary structures of the three Bmtutl isoforms are mainly composed of random coil, α-helix, β-turn and extended strand, and the proportion of random coil is the highest. However, PredictProtein analysis indicated that there was a large difference in protein/polynucleotide binding sites between Bmtutl-464, Bmtutl-519 and Bmtutl-810. qPCR analysis showed that the expression of *Bmtutl*-464, *Bmtutl*-519 and *Bmtutl*-810 in the midgut, hemolymph and fat body of *B. mori* larvae was inhibited after *N. bombycis* infection, and most significantly inhibited in the fat body. The expression of *Bmtutl*-519 and *Bmtutl*-810 in the fat body of *B. mori* larvae infected by *N. bombycis* was strongly inhibited since 72 h post inoculation, and especially the relative expression level of *Bmtutl*-519 in the fat body in the treatment group was less than 5.0% of that in the control. 【Conclusion】The three isoforms of Bmtutl have different sequence characteristics. *N. bombycis* infection inhibits the expression of *Bmtutl*-464, *Bmtutl*-519 and *Bmtutl*-810 in the midgut, hemolymph and fat body of *B. mori* larvae, especially the expression of *Bmtutl*-519. These results suggest that Bmtutl-519 protein may play a major role in the process of *N. bombycis* infecting the silkworms as compared with the other two Bmtutl isoforms.

Key words: *Bombyx mori*; *Nosema bombycis*; *Bombyx mori* Turtle protein; sequence analysis; phase expression

在探索微孢子虫侵染机制的早期研究中发现，微孢子虫的孢壁蛋白在微孢子虫的孢子发芽过程中发挥了积极作用，孢壁蛋白的存在与否直接影响着孢子发芽，进而影响微孢子虫对宿主的侵染能力(Enriquez *et al.*, 1998; Sak *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2007)。最近研究发现在微孢子虫侵染过程中，微孢子虫可通过特殊的机制粘附在宿主细胞表面，从而增强侵染宿主细胞的效率。研究表明，抑制这种粘附作用就能控制微孢子虫的感染(Hayman *et al.*, 2005; Southern *et al.*, 2006; Cai *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2014)。家蚕微孢子虫 *Nosema bombycis* 孢壁蛋白 NbSWP26(*Nosema bombycis* spore wall protein 26)参与了家蚕微孢子虫对宿主家蚕的粘附过程，进而影响了孢子对宿主细胞的侵染(Li *et al.*, 2009)。我们通过免疫共沉淀技术，在细胞水平筛选到一个与 NbSWP26 具有相互作用的细胞粘附分子家蚕海龟蛋白(*Bombyx* Turtle, Bmtutl)(Zhu *et al.*, 2013)。

细胞粘附分子是一类位于细胞膜表面的糖蛋白分子，可分为免疫球蛋白超家族、整合素家族、选择素家族、钙黏素家族四大类。它们可通过识别与其粘附的特异性受体参与细胞与细胞之间及细胞与细胞外基质之间的相互作用，以及通过与其他细胞表面受体的相互作用来调节细胞内信号的转导，与细胞发育、炎症反应、免疫应答以及肿瘤浸润转移等密切相关(Li and Feng, 2011; Weber *et al.*, 2011; Zhong and Rescorla, 2012)。Bmtutl 属于免疫球蛋白超家族中的一员，该蛋白超家族主要包括两类，一类是脊椎动物中免疫球蛋白超家族 9，另一类是无脊椎动物中的海龟蛋白(Doudney *et al.*, 2002)。

昆虫海龟蛋白是无脊椎动物免疫球蛋白超家族的一个新成员，2001 年首次在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中发现。果蝇海龟蛋白基因存在可变性剪接，其转录本可产生至少 6 种不同的海龟蛋白亚型(Bodily *et al.*, 2001; Hansen and Walmod, 2013)。功能研究表明，海龟蛋白作为细胞表面配体或辅助受体在果蝇中枢神经系统发育过程中起重要作用，可通过分子识别作用引起树突的自我回避反应，避免细胞之间的重叠(Long *et al.*, 2009)。此外，它们还可以通过介导细胞与细胞之间的相互作用，调节感光神经细胞 R7 末端的分布(Ferguson *et al.*, 2009)。前期我们对 Bmtutl 进行了初步研究，结果表明 Bmtutl 与免疫球蛋白超家族成员一样，也存在可变剪接，并且参与了家蚕微孢子虫的粘附式侵染过程(Zhu *et al.*, 2017)。本研究对之前我们获得的 3 条 Bmtutl 转录本(Bmtutl-464/GenBank No. KY350196.1, Bmtutl-519/GenBank No. KY350197.1 和 Bmtutl-810/GenBank No. KY350198.1)的序列结构特征做了进一步分析，并在蚕体水平检测了家蚕微孢子虫感染后对 *Bmtutl*-464, *Bmtutl*-519 和 *Bmtutl*-810 基因表达水平的影响，为揭示家蚕微孢子虫的侵染机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 生物材料与主要试剂

1.1.1 家蚕和微孢子虫：供试家蚕品系大造（P50）由云南省农业科学院蚕桑蜜蜂研究所家蚕育种与繁育研究室提供，新鲜桑叶常规饲养，饲养温度为25℃；供试家蚕微孢子虫 *N. bombycis* 由本单位家蚕病虫害研究室保存。

1.1.2 主要试剂：TRIzol® Reagent 购自美国Invitrogen 公司；PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser（Perfect Real Time）反转录试剂盒与SYBR® Premix Ex Taq™ Ⅱ（Tli RNaseH Plus）荧光定量 PCR 试剂盒购自宝生物工程（大连）有限公司。

1.2 家蚕海龟蛋白序列的获得与生物信息学分析

根据 NCBI 数据库中已登录信息获取 3 条家蚕海龟蛋白亚型，Bmtutl-464（GenBank 登录号：KY350196.1），Bmtutl-519（GenBank 登录号：KY350197.1）和 Bmtutl-810（GenBank 登录号：KY350198.1）。利用 ComputepI/Mw tool（http://web.expasy.org/compute_pi/）对上述蛋白进行分子量与等电点预测；用 SMART（http://smart.embl-heidelberg.de/）进行结构域预测；蛋白二级结构组成、蛋白结合位点、多核苷酸结合位点与二硫键位点预测利用 PredictProtein（https://predictprotein.org/home）完成。

1.3 家蚕微孢子虫的纯化与感染

取 4℃保存的家蚕微孢子虫悬液（1×10^6 个/mL）涂抹于桑叶上，添食 3 龄起蚕，至 5 龄大蚕发病时，收集病蚕中肠和丝腺组织并充分研磨，用两层纱布过滤去除蚕体组织碎片及蚕粪等，3 000 r/min 离心 20 min。收集乳白色沉淀并重悬于蒸馏水中，反复 5 次，直至镜检基本无组织碎片，血球计数器计数并保存备用（Zhu *et al*., 2011）。

处理组将上述制备的新鲜微孢子虫悬液浓度调节至 2.0×10^7 个/mL，对照组以清水代替家蚕微孢子虫悬液，添食 5 龄起蚕，并分别在 12，24，48，72，96 和 120 h 后随机选取供试家蚕，各时间点以 5 头蚕为 1 个样品，共 3 个重复，解剖获其血淋巴、中肠与脂肪体组织，置于液氮中迅速冷却后于 －80℃ 超低温冰箱保存。

1.4 引物设计与合成

依据获得最优扩增特异性和扩增效率的原则设计 qPCR 引物，利用 Primer Premier 5.0 软件设计目的基因特异性引物（表 1），以家蚕 *Actin*3（GenBank 登录号：U49854.1）作为内参基因，所有引物序列由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

表 1 实验所用引物
Table 1 Primers used in the experiment

基因 Gene	引物序列（5′－3′） Primer sequences	预期产物大小（bp） Predicted product size
Bmtutl-464	F：TCACCAGGGCCGGTACACTTG R：CCGAAAACCATCGACCTTCCTC	144
Bmtutl-519	F：ACAGTGGAACCCGAACCATTAT R：TTCATTTCGTTAACGCTGACC	244
Bmtutl-810	F：AGTGACAGAGGTTCATAATGGAT R：GGTCGTATCTGGCCCCTGTTGA	134
*Actin*3	F：CCGTATGCGAAAGGAAATCA R：TTGGAAGGTAGAGAGGGAGG	126

1.5 总 RNA 的提取与反转录

取 1.3 节中 －80℃超低温冰箱保存备用的家蚕组织样品，根据TRIzol® Reagent 试剂盒说明书提取 RNA，获得的总 RNA 使用双光束紫外/可见光核酸蛋白分析仪检测 RNA 样品的浓度和纯度。用PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒中的 gDNA Eraser 消化处理去除基因组 DNA 的污染，随后将 RNA 反转录成 cDNA，获得的cDNA 置于 －20℃ 备用。

1.6 qPCR 检测与数据分析

以 1.5 节获得的 cDNA 为模板，采用SYBR® Green 方法进行 qPCR 检测。20 μL 反应体系：2 × SYBR® Premix Ex Taq Ⅱ 10 μL，上下游引物 F/R（10 μmol/L）各 0.4 μL，ROX Reference Dye 0.4 μL，稀释后 cDNA 模板 2.0 μL，用 RNA-free H_2O 补足至 20 μL。反应条件：95℃ 5 min；95℃ 15 s，68℃ 30 s，共 40 个循环。扩增后用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法（Livak and Schmittgen，2001）计算基因相对表达量，并利用

在线 GraphPad Prism 软件(http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm)进行差异显著性分析。实验设置 3 个生物学重复。

2 结果

2.1 家蚕海龟蛋白的序列分析

家蚕海龟蛋白亚型基因 *Bmtutl*-464 序列的开放阅读框长 1 395 bp,G + C 含量为 48.0%,编码 464 个氨基酸残基,预测其蛋白理论分子量为 51.5 kD,等电点(pI)为 5.68。该蛋白的二级结构主要由 4 种形式组成。其中无规则卷曲(random coil)所占比例最大,占 42.67%;延伸链(extended strand)占 31.47%;α 螺旋(alpha helix)占 15.52%;β 转角(beta turn)占 10.34%。SMART 软件分析显示 Bmtutl-464 蛋白有信号肽,并拥有 2 个 IG 结构域和 2 个 IGc2 结构域。免疫球蛋白结构域一般通过二硫键的结合形成稳固的双片层夹心结构,通过分析表明 Bmtutl-464 含有 4 个二硫键,分别位于：Cys_{49}-Cys_{174},Cys_{126}-Cys_{223},Cys_{265}-Cys_{361} 与 Cys_{318}-Cys_{412} 氨基酸残基之间。此外,通过 PredictProtein 软件分析发现,Bmtutl-464 含有 10 个蛋白结合位点可介导蛋白-蛋白之间的相互作用,分别位于：Met_1,Glu_{55},Gly_{70}-Thr_{72},Tyr_{93},Arg_{99},Pro_{105},Ala_{365},Pro_{383}-Thr_{386},Pro_{441} 和 Ile_{464}。

家蚕海龟蛋白亚型基因 *Bmtutl*-519 序列的开放阅读框长 1 560 bp,G + C 含量为 50.0%,编码 519 个氨基酸残基,预测其蛋白理论分子量为 57.7 kD,等电点(pI)为 5.55。该蛋白的二级结构主要由 4 种形式组成。其中无规则卷曲占 42.39%,延伸链占 31.98%,α 螺旋占 15.22%,β 转角占 10.40%,与 Bmtutl-464 蛋白亚型基本一样。SMART 软件分析显示 Bmtutl-519 蛋白有信号肽,并拥有 2 个 IG 结构域和 3 个 IGc2 结构域。软件分析表明 Bmtutl-519 含有 5 个二硫键,分别位于：Cys_{49}-Cys_{174},Cys_{126}-Cys_{223},Cys_{265}-Cys_{318},Cys_{361}-Cys_{412} 与 Cys_{457}-Cys_{507} 氨基酸残基之间,与 Bmtutl-464 蛋白亚型有一定差异。此外,通过 PredictProtein 软件分析发现,Bmtutl-464 含有 12 个蛋白结合位点,分别位于：Met_1,Glu_{55},Glu_{71}-Thr_{72},Pro_{195},Ala_{269},Arg_{299},Ala_{365},Pro_{383},Gln_{385}-Thr_{386},Glu_{461}-Ser_{462},Gln_{481},Arg_{499}。

家蚕海龟蛋白亚型基因 *Bmtutl*-810 序列的开放阅读框长 2 433 bp,G + C 含量为 50.0%,编码 810 个氨基酸残基,预测其蛋白理论分子量为 89.7 kD,等电点(pI)为 7.23。该蛋白的二级结构同样主要由 4 种形式组成。其中无规则卷曲占 43.09%,延伸链占 31.36%,α 螺旋占 14.44%,β 转角占 11.11%。4 种形式组成比例与蛋白亚型 Bmtutl-464 和 Bmtutl-519 的差异并不明显。SMART 软件分析显示 Bmtutl-810 蛋白有信号肽,除含有 2 个 IG 结构域和 3 个 IGc2 结构域之外,还拥有 2 个Ⅲ型纤连蛋白结构域和 1 个跨膜结构域。软件分析表明 Bmtutl-810 与 Bmtutl-519 一样也含有 5 个二硫键且位置相同,分别位于：Cys_{49}-Cys_{174},Cys_{126}-Cys_{223},Cys_{265}-Cys_{318},Cys_{361}-Cys_{412} 与 Cys_{457}-Cys_{507} 氨基酸残基之间。此外,通过 PredictProtein 软件分析发现,Bmtutl-810 含有 11 个蛋白结合位点,分别位于：Met_1,Glu_{71}-Thr_{72},Arg_{299},Thr_{386},Pro_{628},Gly_{649},Pro_{654},Ala_{694},Trp_{696},Glu_{707}-Glu_{708},Leu_{810} 和 2 个多核苷酸结合位点,分别位于：Asn_{779}-Arg_{784},Lys_{780}-Arg_{784}。

2.2 家蚕微孢子虫感染对家蚕幼虫中肠中 Bmtutl 基因表达水平的影响

家蚕微孢子虫经口感染家蚕后,中肠是微孢子虫首先侵染的组织。我们利用 qPCR 对家蚕微孢子虫感染后,家蚕中肠 *Bmtutl*-464,*Bmtutl*-519 和 *Bmtutl*-810 基因的时相表达水平进行了定量分析(图 1)。由图 1(A)可以看出,家蚕微孢子虫感染后的 12,24,48,72,96 和 120 h,幼虫中肠中 *Bmtutl*-464 基因的表达基本处于被抑制状态,特别是感染后的 120 h 与对照组差异显著($P < 0.05$)(图 1：A)。*Bmtutl*-810 基因的表达变化情况与 *Bmtutl*-464 的基本一致(图 1：C)。相对于对照组,中肠中 *Bmtutl*-519 基因的表达也受到了一定影响(图 1：B),特别是感染的初期阶段 *Bmtutl*-519 基因表达水平变化很大,感染后 12 h 该基因表达受到了显著抑制($P < 0.05$),是对照组的 22.7%。但是感染 24 h 时,其表达水平又呈显著的上调趋势,是对照组的 11.9 倍。随着感染时间的延长,*Bmtutl*-519 基因的表达受到逐渐抑制,感染后 120 h 是对照组的 12.0%($P < 0.01$)。

2.3 家蚕微孢子虫感染对家蚕幼虫血淋巴中 Bmtutl 基因表达水平的影响

在家蚕幼虫血淋巴中,家蚕微孢子虫感染后几乎所有的时间节点 *Bmtutl*-464 和 *Bmtutl*-810 基因的表达水平都处于被抑制状态,但抑制率并不显著($P > 0.05$)(图 2：A,C)。感染后的 12,24 和 48 h *Bmtutl*-519 基因的表达受到显著抑制($P < 0.05$),分

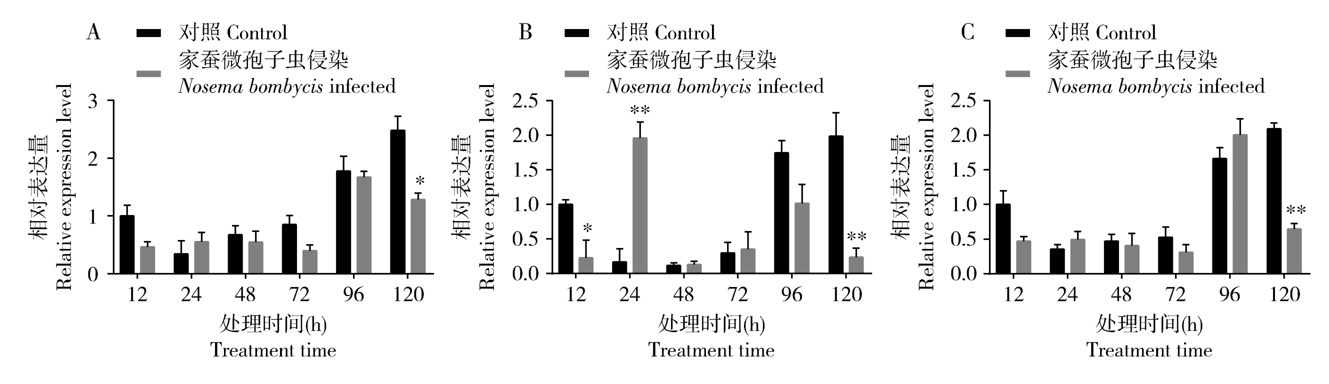


图 1　感染家蚕微孢子虫后家蚕幼虫中肠中 Bmtutl 不同亚型基因的表达水平

Fig. 1　Expression levels of Bmtutl isoform genes in the midgut of *Bombyx mori* larvae infected by *Nosema bombycis*

A: *Bmtutl*-464; B: *Bmtutl*-519; C: *Bmtutl*-810. 图中数据为平均值 ± 标准差;柱上星号和双星号分别表示同一时间点与对照(清水)间差异显著($P<0.05$)和极显著($P<0.01$)(T 检验)。图 2 和 3 同。Data in the figure are mean ± *SD*. The asterisk and double asterisk above bars indicate significant difference ($P<0.05$) and extremely significant difference ($P<0.01$), respectively, from the control (water) at the same time point (T-test). The same for Figs. 2 and 3.

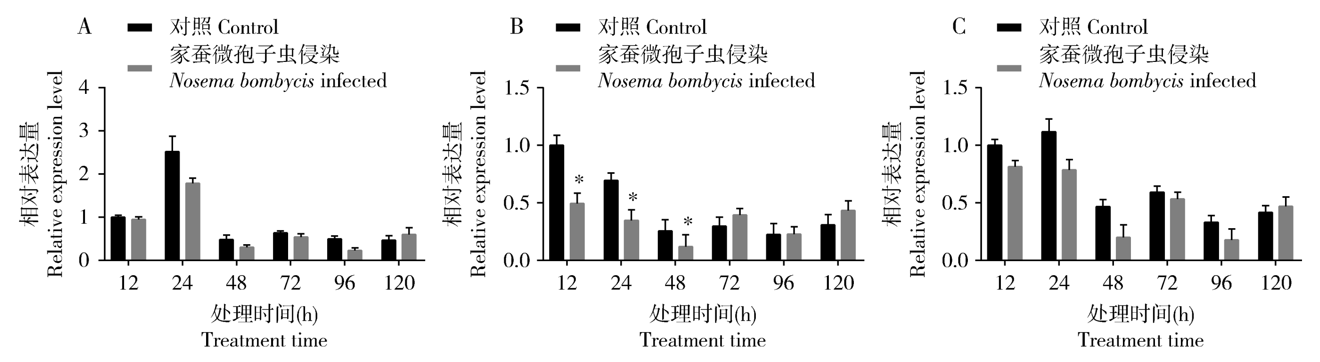


图 2　感染家蚕微孢子虫后家蚕幼虫血淋巴中 Bmtutl 不同亚型基因的表达水平

Fig. 2　Expression levels of Bmtutl isoform genes in the hemolymph of *Bombyx mori* larvae infected by *Nosema bombycis*

A: *Bmtutl*-464; B: *Bmtutl*-519; C: *Bmtutl*-810.

别是对照组的 50.0%, 50.0% 和 45.5%。然而,感染后的 72, 96 和 120 h *Bmtutl*-519 基因的表达水平呈上调趋势,分别是对照组的 1.3, 1.0 和 1.4 倍(图 2: B),与 *Bmtutl*-464 和 *Bmtutl*-810 基因的表达趋势不同。

2.4　家蚕微孢子虫感染对家蚕幼虫脂肪体中 Bmtutl 基因表达水平的影响

脂肪体中 *Bmtutl*-464, *Bmtutl*-519 和 *Bmtutl*-810 基因的表达水平,在家蚕微孢子虫感染后的某些时间节点或者所有时间节点受到明显的抑制,与对照组相比差异显著。感染后的 12, 24, 48, 72, 96 和 120 h,*Bmtutl*-464 基因的表达水平分别是对照组的 66.7%, 83.3%, 103.3%, 16.7%, 140.9% 和 27.8%(图 3: A);*Bmtutl*-519 基因的表达水平分别是对照组的 33.3%, 32.3%, 47.6%, 4.5%, 4.8% 和 2.4%(图 3: B);*Bmtutl*-810 基因的表达水平分别是

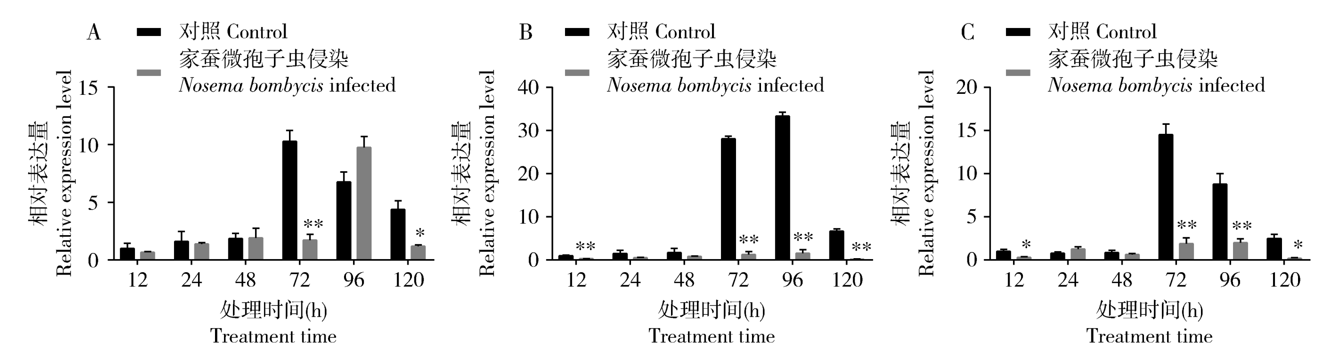


图 3　感染家蚕微孢子虫后家蚕幼虫脂肪体中 Bmtutl 不同亚型基因的表达水平

Fig. 3　Expression levels of Bmtutl isoform genes in the fat body of *Bombyx mori* larvae infected by *Nosema bombycis*

A: *Bmtutl*-464; B: *Bmtutl*-519; C: *Bmtutl*-810.

对照组的 30.0%，150.4%，71.4%，13.2%，22.7% 和 8.0%（图 3：C）。结果分析表明，*Bmtutl*-519 和 *Bmtutl*-810 基因的表达水平在家蚕微孢子虫感染家蚕后的 72 h 开始受到显著抑制（$P < 0.05$），特别是 *Bmtutl*-519 基因在感染 72 h 之后，其基因表达水平均不到对照的 5.0%。说明与其他两种家蚕海龟蛋白亚型相比，Bmtutl-519 蛋白很可能在家蚕微孢子虫侵染宿主的过程中起主要作用。

3　讨论

家蚕海龟蛋白 Bmtutl 作为免疫球蛋白超家族的一员，目前在家蚕中获得了其 3 种蛋白亚型，即 Bmtutl-464，Bmtutl-519 和 Bmtutl-810（Zhu *et al*., 2017）。本研究通过对这 3 种蛋白亚型的序列结构特征分析表明，它们的蛋白二级结构组成与占比基本一致，相互之间存在微弱差异。但是，通过蛋白/多核苷酸结合位点分析发现，Bmtutl-464，Bmtutl-519 和 Bmtutl-810 之间存在较大差异。除蛋白结合位点分布不同之外，Bmtutl-810 还拥有 2 个多核苷酸结合位点。表明家蚕海龟蛋白这 3 种亚型的生物学功能存在差异。

Zhu 等(2017)通过对家蚕海龟蛋白不同亚型在家蚕 P50 不同组织中的荧光定量分析结果发现，Bmtutl-519 与 Bmtutl-810 在家蚕 5 龄第 3 天幼虫血液中的表达量最高，头部与脂肪体中的表达量次之；而 Bmtutl-464 在家蚕 5 龄第 3 天幼虫性腺组织精巢、卵巢中的表达量最高，血液中的表达量次之。因此，本研究选取家蚕微孢子虫首先感染的家蚕幼虫中肠组织以及家蚕海龟蛋白表达水平较高的幼虫血淋巴和脂肪体组织作为主要研究对象，对家蚕进行微孢子虫感染和荧光定量 PCR 分析。研究发现，感染家蚕微孢子虫后，家蚕幼虫中肠、血淋巴与脂肪体组织中 *Bmtutl*-464，*Bmtutl*-519 和 *Bmtutl*-810 基因的整体表达水平处于被抑制状态，尤其在脂肪体中最为明显。脂肪体作为昆虫的免疫反应器官，在应对外界病原微生物入侵过程中发挥重要作用（Kounatidis and Ligoxygakis, 2012）。例如，大肠杆菌 *Escherichia coli*、球孢白僵菌 *Beauveria bassiana*、藤黄微球菌 *Micrococcus luteus* 与家蚕核型多角体病毒（*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, BmNPV）感染，可引起家蚕脂肪体组织中丝氨酸蛋白酶抑制剂的显著上调（Zhao *et al*., 2012；Gao *et al*., 2018）。

与其他两种家蚕海龟蛋白亚型基因相比，家蚕微孢子虫感染 72 h 后，脂肪体中 *Bmtutl*-519 基因的表达水平受到最为强烈的抑制，暗示 Bmtutl-519 蛋白很可能在家蚕微孢子虫侵染宿主的过程中起主要作用。这一结果与我们之前的研究报道（Zhu *et al*., 2017）相一致。Bmtutl-519 的过表达在一定程度可以促进家蚕微孢子虫对家蚕卵巢细胞 BmN 的粘附，但并没有增加微孢子虫对细胞的感染率，相反 Bmtutl-519 的过表达对家蚕微孢子虫的增殖具有抑制作用（Zhu *et al*., 2019）。因此在侵染家蚕的过程中，为了营造有利于自身生存增殖的环境，家蚕微孢子虫通过某些方式抑制了家蚕海龟蛋白的表达。然而，具体的调节机制尚不清楚。

本研究结果丰富了我们对免疫球蛋白超家族成员的认识，明确了家蚕微孢子虫感染对家蚕幼虫中肠、血淋巴和脂肪体组织中 *Bmtutl*-464，*Bmtutl*-519 和 *Bmtutl*-810 基因表达水平的影响，为进一步探索家蚕微孢子虫侵染宿主的分子机制奠定了一定基础。

参考文献（References）

Bodily KD, Morrison CM, Renden RB, Broadie K, 2001. A novel member of the Ig superfamily, turtle, is a CNS-specific protein required for coordinated motor control. *J. Neurosci*., 21(9): 3113–3125.

Cai SF, Lu XM, Qiu H, Li M, Feng Z, 2011. Identification of a *Nosema bombycis* (Microsporidia) spore wall protein corresponding to spore phagocytosis. *Parasitology*, 138(9): 1102–1109.

Doudney K, Murdoch JN, Braybrook C, Paternotte C, Bentley L, Copp AJ, Stanier P, 2002. Cloning and characterization of *Igsf9* in mouse and human: a new member of the immunoglobulin superfamily expressed in the developing nervous system. *Genomics*, 79(5): 663–670.

Enriquez FJ, Wagner G, Fragoso M, Ditrich O, 1998. Effects of an anti-exospore monoclonal antibody on microsporidial development *in vitro*. *Parasitology*, 117(Pt 6): 515–520.

Ferguson K, Long H, Cameron S, Chang WT, Rao Y, 2009. The conserved Ig superfamily member Turtle mediates axonal tiling in *Drosophila*. *J. Neurosci*., 29(45): 14151–14159.

Gao Q, Yang L, Dai J, Yuan G, Wang L, Qian C, Zhu B, Liu C, Wei G, 2018. Characterization and functional analysis of serpin-28 gene from silkworm, *Bombyx mori*. *J. Invertebr. Pathol*., 159: 18–27.

Hansen M, Walmod PS, 2013. IGSF9 family proteins. *Neurochem. Res*., 38(6): 1236–1251.

Hayman JR, Southern TR, Nash TE, 2005. Role of sulfated glycans in adherence of the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis* to host cells *in vitro*. *Infect. Immun*., 73(2): 841–848.

Kounatidis I, Ligoxygakis P, 2012. *Drosophila* as a model system to unravel the layers of innate immunity to infection. *Open Biol*., 2

(5): 120075.

Li DM, Feng YM, 2011. Signaling mechanism of cell adhesion molecules in breast cancer metastasis: potential therapeutic targets. *Breast Cancer Res. Treat.*, 128(1): 7-21.

Li YH, Wu ZL, Pan GQ, He WW, Zhang RZ, Hu JH, Zhou ZY, 2009. Identification of a novel spore wall protein (SWP26) from microsporidia *Nosema bombycis*. *Int. J. Parasitol.*, 39(4): 391-398.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 25(4): 402-408.

Long H, Ou Y, Rao Y, van Meyel DJ, 2009. Dendrite branching and self-avoidance are controlled by Turtle, a conserved IgSF protein in *Drosophila*. *Development*, 136(20): 3475-3484.

Sak B, Sakova K, Ditrich O, 2004. Effects of a novel anti-exospore monoclonal antibody on microsporidial development *in vitro*. *Parasitol. Res.*, 92(1): 74-80.

Southern TR, Jolly CE, Lester ME, Hayman JR, 2006. Identification of a microsporidia protein potentially involved in spore adherence to host cells. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 53(Suppl.): 68-69.

Weber GF, Bjerke MA, DeSimone DW, 2011. Integrins and cadherins join forces to form adhesive networks. *J. Cell Sci.*, 124(Pt 8): 1183-1193.

Yang D, Dang X, Peng P, Long M, Ma C, Qin JJ, Wu H, Liu T, Zhou X, Pan G, Zhou Z, 2014. NbHSWP11, a microsporidia *Nosema bombycis* protein, localizing in the spore wall and membranes, reduces spore adherence to host cell BME. *J. Parasitol.*, 100(5): 623-632.

Zhang F, Lu X, Kumar VS, Zhu H, Chen H, Chen Z, Hong J, 2007. Effects of a novel anti-exospore monoclonal antibody on microsporidial *Nosema bombycis* germination and reproduction *in vitro*. *Parasitology*, 134(Pt 11): 1551-1558.

Zhao P, Dong Z, Duan J, Wang G, Wang L, Li Y, Xiang Z, Xia Q, 2012. Genome-wide identification and immune response analysis of serine protease inhibitor genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *PLoS ONE*, 7(2): e31168.

Zhong X, Rescorla FJ, 2012. Cell surface adhesion molecules and adhesion-initiated signaling: understanding of anoikis resistance mechanisms and therapeutic opportunities. *Cell. Signal.*, 24(2): 393-401.

Zhu F, Shen ZY, Guo XJ, Xu XF, Tao HP, Tang XD, Xu L, 2011. A new isolate of *Nosema* sp. (Microsporidia, Nosematidae) from *Phyllobrotica armata* Baly (Coleoptera, Chrysomelidae) from China. *J. Invertebr. Pathol.*, 106(2): 339-342.

Zhu F, Shen ZY, Hou JG, Zhang J, Geng T, Tang XD, Xu L, Guo XJ, 2013. Identification of a protein interacting with the spore wall protein SWP26 of *Nosema bombycis* in a cultured BmN cell line of silkworm. *Infect. Genet. Evol.*, 17: 38-45.

Zhu F, Tang XD, Xiao SY, Wang HL, Zhang YH, Shao YL, Tang FF, Chen SL, Bai XR, 2019. The role of *Bombyx mori* Bmtutl-519 protein in the infection of BmN cells by *Nosema bombycis*. *Dev. Comp. Immunol.*, 92: 283-290.

Zhu F, Xiao SY, Zhang YH, Shao YL, Tang FF, Chen SL, Bai XR, 2017. Molecular characterization and expression analysis of Turtle protein in silkworm that is associated with *Nosema bombycis* infection. *Infect. Genet. Evol.*, 52: 67-74.

(责任编辑：马丽萍)